published: 22 October 2022
doi.org/10.56121/2181-2926-2022-6-20-25

Article

FEATURES OF POLYMORPHISM OF GENES CONTROLLING THE HEMOSTASIS SYSTEM IN DEEPLY PREMATURE NEWBORNS WITH HEMORRHAGIC DISORDERS

Budalova A.V.[1], **Kharlamova N.V.**[2], **Fetisova I.N.**[3], **Ratnikova S.Yu.**[4]

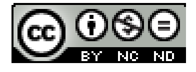
1. Russian Federation, Ivanovo, Federal State Budgetary Institution «Iv Research Institute of the Ministry of Foreign Affairs named after V.N. Gorodkov» of the Ministry of Health of Russia, anesthesiologist- resuscitator of the Neonatal Intensive Care Unit.
2. Russian Federation, Ivanovo, Federal State Budgetary Institution «Iv Research Institute of the Ministry of Foreign Affairs named after V.N. Gorodkov» of the Ministry of Health of Russia, Doctor of Medical Sciences, docent , Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Neonatology, Anesthesiology and Resuscitation.
3. Russian Federation, Ivanovo, Federal State Budgetary Institution «Iv Research Institute of the Ministry of Foreign Affairs named after V.N. Gorodkov» of the Ministry of Health of Russia, Doctor of Medical Sciences, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Clinical Biochemistry and Genetics.
4. Russian Federation, Ivanovo, Federal State Budgetary Institution «Iv Research Institute of the Ministry of Foreign Affairs named after V.N. Gorodkov» of the Ministry of Health of Russia, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Clinical Biochemistry and Genetics.

OPEN ACCESS
IJSP

Academic Editor: Arzikulov A. Professor, Andijan State Medical Institute

Received: 08 October 2022
Accepted: 14 October 2022
Published: 22 October 2022

Publisher's Note: IJSP stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Abstract. Currently, there is a need for a comprehensive assessment of the state of the hemostasis system in deeply premature newborns, including not only an assessment of the state of the vascular wall, platelet and plasma links of hemostasis, as well as the identification of features of polymorphism of genes controlling hemostasis. The identification of these features will help in predicting the development of hemorrhagic disorders in deeply premature newborns, which will make it possible to personalize the management tactics of this category of patients and reduce the rates of disability and infant mortality. In order to identify variants of polymorphism of genes of the hemostasis system in deeply premature newborns, a genetic examination of 99 children with a gestation period of up to 32 weeks was performed. With the definition of gene polymorphism: F2, F7, F13A1, FGB, ITGA2-a2, ITGB3-b3, PAI1. The study established combined variants of hemostasis gene polymorphism in children with hemorrhagic disorders, which can serve as a predictor of the formation of disorders in the hemostasis system.

Key words: newborns, genes, hemostasis system, polymorphism, hemorrhagic disorders.

Введение (Introduction). В современной перинатологии актуальной проблемой по-прежнему остается поиск способов оптимизации тактики ведения глубоко недоношенных новорожденных, направленных на предупреждение инвалидизирующих последствий и тем самым снижение младенческой смертности [1,2]. Течение раннего неонатального периода у глубоко недоношенных новорожденных, нередко осложняется развитием геморрагических нарушений, что несомненно утяжеляет процессы адаптации новорожденных к внеутробному существованию. Система гемостаза, является одной из основных систем организма, участвующих в процессе адаптации [3,4,5]. Развитие геморрагических нарушений у детей, рожденных ранее 32 недель гестации, обусловлены как анатомо-физиологическими особенностями, связанными с недоношенностью и незрелостью, а также состоянием сосудистой стенки, морфофункциональными особенностями звеньев свертывающей и противосвертывающей систем и особенностями полиморфизма генов, контролирующих гемостаз [6, 11]. Наибольшее количество научных работ по изучению системы гемостаза у глубоко недоношенных новорожденных направлены на изучение состояния сосудистой стенки и факторов плазменного звена гемостаза, в последнее время все больший интерес исследователей

направлен на определение морфофункциональных свойств тромбоцитов у недоношенных новорожденных и особенностей полиморфизма генов, контролирующих как сосудисто-тромбоцитарное, так и плазменное звенья гемостаза [7]. Знание особенностей фенотипического проявления различных вариантов полиморфизма генов имеет как диагностическую ценность для выявления геморрагических нарушений у детей, так и обуславливает возможность прогнозирования развития нарушений в системе гемостаза. Поэтому существует необходимость составления методики комплексной оценки системы гемостаза с глубоко недоношенного ребенка с учетом тяжести неонатальной патологии, проводимой терапии, варианта геморрагического нарушения.

Цель исследования: установить особенности полиморфизма генов, контролирующих систему гемостаза у глубоко недоношенных новорожденных с геморрагическими нарушениями, выявленными в неонатальном периоде.

Материалы и методы (Methods). На базе отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России с 2019 по 2021 год проведено комплексное обследование 99 детей со сроком гестации до 32 недель. Стабилизация состояния, обследование и лечение всех глубоко недоношенных новорожденных проведено с учетом действующих клинических рекомендаций, стандартов и критериев качества оказания медицинской помощи недоношенным новорожденным. Все новорожденные включены в исследование после оформления добровольного информированного согласия законным представителем. Наличие полиморфизма генов системы гемостаза оценено при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на анализаторе «DTpraim» («ДНК-технология», Россия) с использованием набора реагентов «Кардиогенетика. Тромбофилия». Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь в объеме 0,1 мл, забранная в пробирку с K3EDTA совместно с забором крови для проведения планового биохимического исследования. Выделение ДНК проведено с использованием реактивов «Проба-Рапид-Генетика», Россия. Проведено выявление полиморфизмов генов, контролирующих плазменное звено гемостаза: F2 20210 G> A, F5 1691 G> A, F7 10976 G> A, F13A1 103 G> T, FGB -455 G> A, и генов контролирующих сосудисто-тромбоцитарное звено гемостаза: ITGA2-a2 807 C>T, ITGB3-b3 1565 T>C, PAI1-675 5G>4G.

В ходе исследования выделены две группы новорожденных, в зависимости от наличия геморрагических нарушений в течении раннего неонатального периода: основная группа сформирована из новорожденных с геморрагическими нарушениями (51 ребенок), группа сравнения - 48 детей, у которых геморрагические нарушения отсутствовали. Все геморрагические нарушения классифицированы по МКБ-X.

Статистический анализ полученных данных осуществлялся с использованием программы «Statistica 13.0», электронных таблиц Microsoft Excel XP, использовались непараметрические критерии: Манна - Уитни, Вальда-Вольфовица, Колмогорова – Смирнова, численные характеристики представлены в формате Me [25%;75%]. Сравнение групп по качественным признакам выполнено с исполь-

зованием критерия χ2 Пирсона и двустороннего точечного критерия Фишера. Для оценки статистической значимости различий использовался критерий $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение (Results and discussion). Все новорожденные дети, включенные в исследование, были рождены преждевременно. Гестационный возраст новорожденных основной группы составил –29,0 [28,0;31,0] недель, и был значимо ниже, у детей группы сравнения –31,0 [29,0;31,0] неделя, (p = 0,01).

Характеристика геморрагических нарушений представлена в таблице 1. У глубоко недоношенных новорожденных встречались как отдельные виды геморрагических нарушений, так и их сочетание.

Таблица-1

Варианты геморрагических нарушений у глубоко недоношенных новорожденных	Абсолютное количество	% (от общего количества детей с геморрагическими нарушениями)
Кровотечение из пуповины	2	3,9
Внутрижелудочковое кровоизлияние I степени	19	37,2
Внутрижелудочковое кровоизлияние II степени	23	45,1
Внутрижелудочковое кровоизлияние III и IV степени	1	1,9
Субарахноидальное кровоизлияние	4	7,8
Кровоизлияние в мозжечок и заднюю черепную ямку	2	3,9
Другие внутричерепные кровоизлияния	2	3,9
Желудочно-кишечное кровотечение у новорожденного	10	19,6
Кровоизлияние в кожу у новорожденного	1	1,9
Гематома печени	4	7,8
Легочное кровотечение	10	19,6

Характеристика геморрагических нарушений у обследованных глубоко недоношенных новорожденных.

При проведении анализа данных полиморфизма генов системы гемостаза у глубоко недоношенных новорожденных (табл.2), установлено гетерозиготное носительство аллеля 20210A в гене протромбина у двух детей с геморрагическими нарушениями (2,0%). Из 51 ребенка с основной группы два являлись гетерозиготными носителями лейденской мутации F5 1691G/A (3,9%) а гомозиготный генотип по негативному аллелю не зарегестрирован. Генотип F7 10976G/A имели 19,6% детей основной группы и 18,8% глубоко недоношенных новорождённых группы сравнения, гомозиготное носительство генотипа отмечено у 1 ребенка группы сравнения (p> 0,05). Гетерозиготный вариант генотипа F13A1 T/T выявлен у 20 детей основной группы и 16 детей группы сравнения, что составило 39,2 и 33,3% соответственно (p> 0,05), а гомозиготное носительство установлено в 9,8% случаев у детей с геморрагическими нарушениями и 8,3% случаев без них (p> 0,05). Гетерозиготный вариант генотипа FGB (-455) G/A – зарегистрирован в 43,1 и 35,4% случаев, соответственно (p> 0,05). Гомозиготный вариант генотипа FGB (-455) A/ A установлен у 4 (7,8%) детей с геморрагическими нарушениями и у 6 (12,5%) детей группы срав-

нения (p> 0,05). Гетерозиготный вариант генотипа PAI-1(-675)5G/4G у детей основной группы встречался несколько чаще, чем в группе сравнения, 22 (43,1%) и 16(33,3%) соответственно, однако разница не имела статистической значимости (p> 0,05). Распространенность гомозиготного генотипа по негативному аллелю превышала аналогичный показатель у детей группы сравнения (31,4 и 41,7%), однако разница так же не имела статистической значимости (p> 0,05). Анализ данных полиморфизмов гена тромбоцитарного рецептора к фибриногену ITGB3T1565C не выявил достоверных различий генотипических частот между новорожденными обеих групп.

При анализе данных полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора к коллагену ITGA2 C807T выявлено наличие статистически достоверных различий встречаемости генотипа ITGA2 807 T/T: установлено, что данный генотип чаще встречался у новорожденных группы сравнения - 13 (27,1%) детей, и у 5(9,8%) детей с геморрагическими нарушениями (p= 0,02). Достоверных различий в частоте встречаемости гетерозиготного варианта генотипа установлено не было (p> 0,05). Известно, что интегрин кодирует специализированный рецептор тромбоцитов сосудистой стенки [8,9], тем самым обеспечивая взаимодействие тромбоцитов с поврежденной сосудистой стенкой запуская последующие этапы свертывания крови. Изменение первичной структуры рецептора вызывает изменения его свойств, и приводит к увеличению скорости адгезии тромбоцитов [10]. Можно предположить, что в популяции глубоко недоношенных новорожденных без геморрагических нарушений, включенных в наше исследование, наличие гомозиготного варианта полиморфизма гена ITGA2 C807T играет защитную роль, и приводит к более эффективному гемостатическому эффекту за счет увеличения скорости адгезии тромбоцитов, что и обуславливает отсутствие у данной категории детей геморрагических нарушений в течении раннего неонатального периода.

Таблица-2

Генотип	Основная группа			Группа сравнения			p
	n	N	%	n	N	%	
F2 20210G/G	49	51	96,1%	47	48	97,9%	0,787
F2 20210G/A	2	51	3,9%	1	48	2,1%	0,751
F5 1691G/G	49	51	96,1%	47	48	97,9%	0,787
F5 1691G/A	2	51	3,9%	1	48	2,1%	0,751
F710976 G/G	41	51	80,4%	38	48	79,2%	0,902
F710976 G/A	10	51	19,6%	9	48	18,8%	0,898
F710976 A/A	0	51	0%	1	48	2,1%	0,312
F13A1103G/G	26	51	51%	28	48	58,3%	0,466
F13A1 103G/T	20	51	39,2%	16	48	33,3%	0,538
F13A1 103T/T	5	51	9,8%	4	48	8,3%	0,799
FGB (-455) G/G	25	51	49%	25	48	52,1%	0,764
FGB (-455) G/A	22	51	43,1%	17	48	35,4%	0,437
FGB (-455) A/A	4	51	7,8%	6	48	12,5%	0,446
PAI-1 (-675)5G/5G	13	51	25,5%	12	48	25%	0,954
PAI-1(-675)5G/4G	22	51	43,1%	16	48	33,3%	0,316

PAI-1 (-675)4G/4G	16	51	31,4%	20	48	41,7%	0,286
ITGA2-a2 807C/C	17	51	33,3%	16	48	33,3%	-
ITGA2-a2 807C/T	29	51	56,9%	19	48	39,6%	0,086
ITGA2-a2 807T/T	5	51	9,8%	13	48	27,1%	0,026
ITGB3-b1565T	86	102	84,3%	83	96	86,5%	0,666
ITGB3-b1565C	16	102	15,7%	13	96	13,5%	0,666
ITGB3-b1565T/T	39	51	76,5%	37	48	77,1%	0,944
ITGB3-b1565T/C	8	51	15,7%	9	48	18,8%	0,684
ITGB3-b1565C/C	4	51	7,8%	2	48	4,2%	0,448

Частота встречаемости генотипов в генах системы гемостаза у глубоко недоношенных новорожденных с наличием или отсутствием геморрагических нарушений.

Примечание: N – общее число наблюдений в группе (генотипы); n – число носителей генотипа в группе.

В развитии геморрагических нарушений имеет значение не только присутствие в генотипе определенных негативных полиморфизмов, но и их сочетание.

Анализ данных сочетанного присутствие негативных генотипов показал, что в формировании геморрагических нарушений у глубоко недоношенных новорожденных существенную роль играет сочетанное наследование гетерозиготных вариантов паталогического генотипа II и XIII факторов свертывания крови (табл.3).

Анализ сочетаний генотипических частот в генах, контролирующих сосудисто-тромбоцитарное звено системы гемостаза у глубоко недоношенных новорожденных с геморрагическими нарушениями, различий не выявил.

Таблица-3

Генотип	Основная группа			Группа сравнения			p
	n	N	%	n	N	%	
F2 20210G/A F13A1 103G/T	4	51	7,8	0	48	0	0,04

Сочетание генотипических частот в генах системы гемостаза у глубоко недоношенных новорожденных с наличием или отсутствием геморрагических нарушений.

Примечание: N – общее число наблюдений в группе (генотипы); n – число носителей генотипа в группе.

Выявлено одновременное присутствие в генотипе ребенка полиморфизмов F2 20210G/A и F13A1 103G/T, что может выступать в качестве молекулярно-генетического предиктора формирования геморрагических нарушений.

Выводы (Conclusions). У глубоко недоношенных новорожденных без геморрагических нарушений установлено наличие гомозиготного варианта полиморфизма гена ITGA2 C807T, что обуславливает защитную роль и, по- видимому, приводит к более эффективному гемостатическому эффекту за счет увеличения скорости адгезии тромбоцитов.

Особенностями полиморфизма генов системы гемостаза у глубоко недоношенных новорожденных является одновременное присутствие в генотипе ребенка полиморфизмов F2 20210G/A и F13A1

103G/T, что возможно рассматривать как предиктор повышенного риска формирований геморрагических нарушений.

Исследование полиморфизма генов системы гемостаза является перспективным направлением разработки новых методов прогнозирования и профилактики геморрагических нарушений у глубоко недоношенных новорожденных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Алиева Л.Б., Антонов А.Г., Буркова А.С., Ленюшкина А. А. Частота геморрагических проявлений у глубоконедоношенных детей // Акушерство и гинекология. – 2011. – № 2. – С. 53-57.

2. Szpecht D., Szymankiewicz M., Now-ak I., Gadzinowski J. Intraventricular hemorrhage in neonates born before 32 weeks of gestation-retrospective analysis of risk factors. Childs Nerv Syst 2016; 32: 1399–1404.

3. Черкасова С. В. Гемостаз новорожденных / С. В. Черкасова // Практика педиатра. – 2020. – № 1. – С. 49-52.

4. Шабалов Н.П., Иванов Д.О., Шабалова Н.Н. Гемостаз в динамике первой недели жизни как отражение механизмов адаптации ко внеутробной жизни новорожденного // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. — 2000. — № 3. — С. 22-36

5. Горячко А. Н. Особенности гемостаза у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией в раннем неонатальном периоде /, Е. А. Улезко, Ю. В. Рожко [и др.] // Детская медицина Северо-Запада. – 2020. – Т. 8. – № 1. – С. 127-128.

6. Инновационная технология оценки гемостатического потенциала крови недоношенных новорожденных / Г. Н. Кузьменко, С. Б. Назаров, И. Г. Попова [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2015. – Т. 18. – № 2. – С. 4-10.

7. Toulon P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. Int J Lab Hematol 2016; 38: 66–77.

8. Жерносеков, Д. Д. Структурно-функциональные особенности тромбоцитарных интегринов / Д. Д. Жерносеков // Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. – 2019. – № 1. – С. 3-11.

9. Ассоциация полиморфизма гена интегрина бета-3 с функциональной активностью тромбоцитов у пациентов со стабильной стенокардией напряжения / Т. П. Пронько, О. В. Горчакова, М. Л. Гладкий [и др.] // Микроциркуляция и гемореология : Тезисы докладов, Ярославль, 30 июня – 03 2019 года. – Ярославль: Издательство «Канцлер», 2019. – С. 156.

10. Роль трансмембранных гликопротеинов, интегринов и серпентинов в адгезии и активации тромбоцита / А. Н. Свешникова, А. В. Беляев, М. А. Пантелеев, Д. Ю. Нечипуренко // Биологические мембраны. – 2018. – Т. 35. – № 5. – С. 351-363.

11. Makhmudova, A., Berger, . I., Madasheva, A., & Ulugova, S. (2022). Combined genetic disorders in patients with coagulopathy. International Journal of Scientific Pediatrics, (1), 23–29. https://doi.org/10.56121/2181-2926-2022-1-23-29